

DOI: 10.13376/j.cblls/2015093

文章编号: 1004-0374(2015)06-0670-03



前排: 王应睐

后排左1: 林其谁; 左2: 李伯良

林其谁 (1937—) 研究员, 中国科学院院士。原中国科学院上海生物化学研究所所长 (1984—1995), 历任国家重点基础研究发展计划第一、二、三、五届专家顾问组成员。从事生物膜结构与功能研究, 包括线粒体呼吸链氧化磷酸化、解偶联蛋白、膜脂与多肽相互作用、膜上信号转导受体等。

李伯良 (1950—) 研究员。原中国科学院上海生物化学研究所所长 (1995—2000)。从事胆固醇代谢平衡的基因表达调控研究, 包括人 ACAT 基因的组织结构、表达调控及其与胆固醇代谢平衡过程的生理病理关系等。

成功进行人工全合成结晶牛胰岛素中的科学精神

林其谁, 李伯良

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

1965年9月17日是科技界值得怀念的日子, 中国科学研究人员在实验中观察到人工全合成牛胰岛素的结晶, 确证了人工全合成结晶牛胰岛素工作终于成功。这是世界上第一次用人工方法合成了与天然分子相同化学结构并具有生物活性的蛋白质, 标志着人类在认识生命、探索生命奥秘的征途中迈出了里程碑式的飞跃和开拓了人工全合成蛋白质的新时代, 在生命科学研究发展史上有永恒的意义与影响。实际上, 人工全合成结晶牛胰岛素的成功完全依赖于一系列的科学精神。

1 研究项目提出与准备

1958年夏, 中科院上海生化所的高级研究人员座谈会上提出了三方面研究, 其中之一是人工合成蛋白质的基础理论项目。在所长王应睐主持所内外学术交流基础上, 依据国际上已有氨基酸一级序列结构报道的唯一蛋白质是胰岛素, 生化所于1958年12月18日正式确定了人工合成胰岛素项目, 并于1959年列入国家科研计划。这是中国科学家们,

在当时中国环境下显示的创新胆略和科学雄心。

1955年英国桑格阐明胰岛素一级结构, 由21个氨基酸的A链、30个氨基酸的B链, 通过两对二硫键连接而成, 还有A链内一对二硫键, 全蛋白有17种氨基酸及分子量为5733等特征。此时, *Nature* 期刊也曾预言“合成胰岛素将是遥远的事情”。而中国科学家们跨越“遥远”进入人工合成胰岛素的前沿项目探索之时, 除了掌握国际文献报道、了解学术前沿动态外, 着手进行了一系列艰难的准备, 包括人工合成胰岛素中所必需的原料试剂, 如氨基酸来源的解决、各种技术方法的建立和研究策略、技术路线的确定等等, 以确保项目的实验探索。这些在当时的生化所都进入较系统性的全面安排和一步一个脚印地推进。

2 多路摸索与研究策略

人工合成胰岛素一经推出, 就有针对性地讨论了一系列科学问题。例如: 胰岛素由两对二硫键连接A、B二条肽链组成, 是否二条肽链可分开合成

的问题(涉及完全不同的研究策略和技术路线);即使分开合成了A、B二条肽链,有关二硫键连接有顺接、反接、多接等众多的可能性,是否能正确连接的问题(当时国外文献讨论对正确连接率很悲观);如能提高合成A、B二条肽链的正确连接率,是否获得的合成胰岛素会形成具有生物学活性构型的问题(当时有关蛋白质构型研究的方法极其有限);假如要合成A、B二条肽链,是有机合成、还是酶促或转肽合成相结合的问题(有关肽链全有机合成,当时国际上最长仅有合成由13个氨基酸残基组成的多肽链的文献报道);如是全有机合成,则涉及合成肽段的适宜长短、肽段之间缩合的方式与方向、合成前后的氨基酸基团保护与去保护的问题(当时国际上还无大于13个氨基酸肽链合成的文献报道),等等。

在中国当时的极端困难环境下,生化所以科学家们的专长领衔,进行合成胰岛素前期的兵分五路摸索,包括有机合成、天然胰岛素拆合、肽库及分离分析、酶激活和转肽。经过反复的实验摸索,不断的交流讨论,及时的分析总结,在天然胰岛素A、B肽链拆开再将它们重组的实验探索中成功使拆合重组胰岛素的活性提高到50%时,就果断地将重心集中到有机合成、胰岛素拆合与复性、分离分析这三方面工作上。因为,前期阶段工作摸索的结果,不但显示天然胰岛素A、B肽链的可成功拆开和重组,还表明只要合成具有正确氨基酸排列顺序的A、B肽链,在适宜条件下就可使合成A、B肽链的正确二硫键形成和肽折叠趋向于与天然胰岛素相同的特殊构型。进而,明确了人工合成胰岛素的研究策略,即分别有机合成A和B两条肽链,再进行组合复性,最后鉴定生物学活性和各种理化性质。

特别值得一提的是,生化所正式确定人工合成胰岛素项目的同时,就摸索并建成了专门制备氨基酸等试剂的工厂——东风生化试剂厂,不但为人工合成胰岛素项目,也为我国的相关研究提供了大量的生化试剂,不愧为转化应用的早期典范。

3 实验设计与技术路线

在人工合成胰岛素的多路摸索中,不管是天然胰岛素拆合实验以确定研究策略,还是肽链有机合成实验以成熟技术路线,成功均源自于始终不断设计和系统优化实验、始终不断重复和交流总结实验、始终不断调整和大胆探索实验等。而且,在非常多

的各种小试实验中,确确实实印证了“失败是成功之母”,科学前沿探索不但要有胆略,还必须要有毅力和敢于自信、善于坚持。

在天然胰岛素拆合早期实验中,涉及到大量的实验设计,有书面总结的98次实验(包括胰岛素还原和A、B肽链的分离纯化、定量分析、重氧化等)结果表明,胰岛素活性的出现正是由于拆开的A、B二条肽链的正确重组,而非由于少量残留的天然胰岛素。而后的2个月,又进行100多次的胰岛素拆合条件及酸性仲丁醇抽提复性的优化实验,才可重复地获得了拆合后的高活性重组胰岛素结晶,并且进行一系列的生化鉴定包括兔血糖降低和小鼠惊厥活性定量测定、电泳及层析行为分析、酶解图谱分析及含硫肽段定位等。这些为研究策略和技术路线的确定等奠定了厚实的基础。

在有机合成胰岛素肽链的实验中,从制备保护基和缩合剂及其性能分析,建立氨基酸和肽段的缩合方法,到不同氨基酸的特异性保护、不同肽段的缩合方式和缩合方向,同样涉及非常大量的实验设计。而且,在进行了多年的难以计数的实验后,才获得共识性的有机合成技术路线,提出对胰岛素的A、B肽链的有机合成既有共性,也有各自特异性。尤其是,有关缩合肽段的保护与大小,在实验中不断调整,直至达到不同层次的保护基最后均稳定且又可全部去除、C端到N端的定向缩合、避免消旋的缩合等,组成了成套的技术方法。这些大量的每一个难点,都通过了无数次的实验设计解决,也都是胰岛素A、B肽链有机合成技术路线的成熟和应用的积累。

4 研究创新与协作突破

人工全合成结晶牛胰岛素,是在国际上无蛋白质合成先例报道的背景下起步探索。一经启动实施,就面临许多关键性步骤,都必须要有创新性的思路和胆略,以期能构建适宜的新技术方法和新研究体系。在我国人工全合成结晶牛胰岛素中关键性的研究创新包括:天然胰岛素的拆合、获得50%以上活性的重组胰岛素结晶、肽段的定向和无消旋缩合、人工合成肽链低损伤的完全去保护基等。

实际上,人工全合成结晶牛胰岛素过程,是不断的研究创新过程,而且是在协作中的不断研究创新,才获得前沿性突破。特别是在当时的环境条件下,进行了特定专家负责的几次协作,也是获得人工全合成结晶牛胰岛素突破的重要基础。人工全合

成结晶牛胰岛素项目，最终由中科院上海生化所、有机所和北大化学系共同完成中，也有两个阶段的协作。一是在1960年10月中科院上海生化所与有机所之间的协作组协调；二是1964年2月中科院生化所、有机所与北大化学系的协作组协调。在生化所负责有机合成B肽链进展较快的基础上，协作组协调有机所与北大化学系有机合成了A肽链，确保了生化所利用天然胰岛素拆合与重组复合性的技术方法及经验进行有机合成A、B两条肽链的成功组合。

5 学术思路与科学实验

生化所在确定人工合成胰岛素项目时，提出许多针对性的学术思路，如摸索拆合天然胰岛素，摸索有机合成胰岛素A、B肽链等。人工全合成结晶牛胰岛素中，通过大量的科学实验获得结果，不断验证了这些重要的学术思路。

人工全合成结晶牛胰岛素的关键性科学问题之一，是三对二硫键是否能正确连接、正确连接后又能否形成有活性的蛋白质构型？尽管当时国际上天然胰岛素拆合中几乎观察不到重组胰岛素的活性，致使国外文献讨论对二硫键的正确连接率很悲观，以及那时研究蛋白质构型的方法也极其有限，但需要对天然胰岛素拆合进行深入科学实验，尤其重视的是有活性重组胰岛素的科学实验。人工全合成结晶牛胰岛素的成功，是第一次证实了二硫键形成具有高选择性而肽链可趋向于折叠成与天然胰

胰岛素相同的特殊构型，亦是第一次以实验结果证明了蛋白质高级结构取决于一级结构。

人工全合成结晶牛胰岛素的另一关键性科学问题，有机合成能否达到胰岛素A、B两条肽链分别为21、30个氨基酸的长度。这在当时国际上最长仅有合成由13个氨基酸残基组成的多肽链的文献报道条件下，对此关键性科学问题也需要进一步的详细科学实验，特别关注的是不同层次保护基的最终稳定性与可去除性、适宜大小肽段的定向缩合等技术方法。人工全合成结晶牛胰岛素的成功，则是第一次证实了可化学合成生物大分子，并且意味着蛋白质能化学合成、核酸也能化学合成，实际上后者确实很快成功。

综上所述，人工全合成结晶牛胰岛素的成功完全依赖于一系列的科学精神，实现了继1828年德国化学合成第一个有机分子尿素之后的又一次飞跃，1965年中国化学合成了第一个生物大分子胰岛素，同时使前沿更有信心追求高一级飞跃，如重组合成生命细胞等。当然，还有极重要因素是人，特别是那个年代的专家们与年轻人们的热情奋进和几次协作组组长王应睐的核心作用，使闯过了许多异乎寻常的难关，做了前人所没有做的事情。另外，值得一提的是，当时的中科院管理，有敢于体现领导责任的各级行政，如当时的上海分院各研究所专家们就没有一位是“右派分子”，表明行政可确保发挥专家们带领年轻人的热情奋进。